

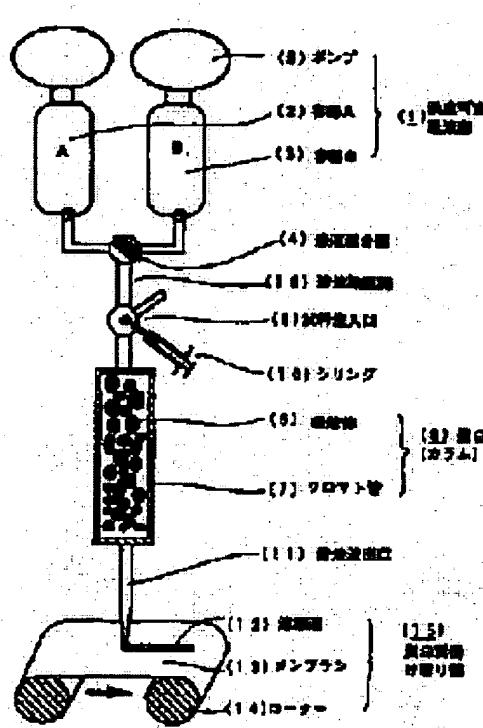
## APPARATUS FOR SEPARATION OF PROTEIN

**Patent number:** JP4210699  
**Publication date:** 1992-07-31  
**Inventor:** NAKABAYASHI MAKOTO; others: 04  
**Applicant:** SUMITOMO ELECTRIC IND LTD  
**Classification:**  
- International: C07K3/20  
- european:  
**Application number:** JP19900400722 19901206  
**Priority number(s):**

### Abstract of JP4210699

**PURPOSE:** To provide the subject apparatus equipped with a concentration-variable liquid supply unit, a protein separation unit containing an immobilized nucleic acid capable of adsorbing various kinds of proteins in a sample, a solution-transport unit for sending a solution thereto and a protein-receiving unit, and capable of precisely separating specified kinds of proteins in a short time.

**CONSTITUTION:** A buffer solution is sent and transferred through a solution-transport pass 16 to a protein separation unit 8 by a concentration-variable liquid supply unit 1 capable of supplying a liquid while varying the concentration of the solution with time. A sample solution of the protein is injected through a sample inlet 9 attached to the solution-transport pass 16 and introduced into a protein separation unit 8 packed with an adsorbent prepared by fixing a nucleic acid capable of specifically adsorbing a specified protein to a rigid carrier having an enough strength to endure the pressure applied during supply or passage of the solution without deformation destruction. The specified protein is adsorbed thereby and an eluent is subsequently introduced to the protein separation unit 8 to elute the adsorbed protein. The eluted protein is then discharged through a solution outlet 11 to a protein-receiving unit 15, thus separating and recovering the objective protein.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(51) Int.Cl.<sup>9</sup>  
C 07 K 3/20識別記号  
序内整理番号  
7731-4H

F I

技術表示箇所

## 審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平2-400722  
 (22)出願日 平成2年(1990)12月6日

(71)出願人 000002130  
 住友電気工業株式会社  
 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
 (72)発明者 中林 誠  
 大阪市此花区島屋一丁目1番3号 住友電  
 気工業株式会社大阪製作所内  
 (72)発明者 丹羽 真一郎  
 大阪市此花区島屋一丁目1番3号 住友電  
 気工業株式会社大阪製作所内  
 (72)発明者 岸本 利彦  
 大阪市此花区島屋一丁目1番3号 住友電  
 気工業株式会社大阪製作所内  
 (74)代理人 弁理士 上代 哲司 (外1名)

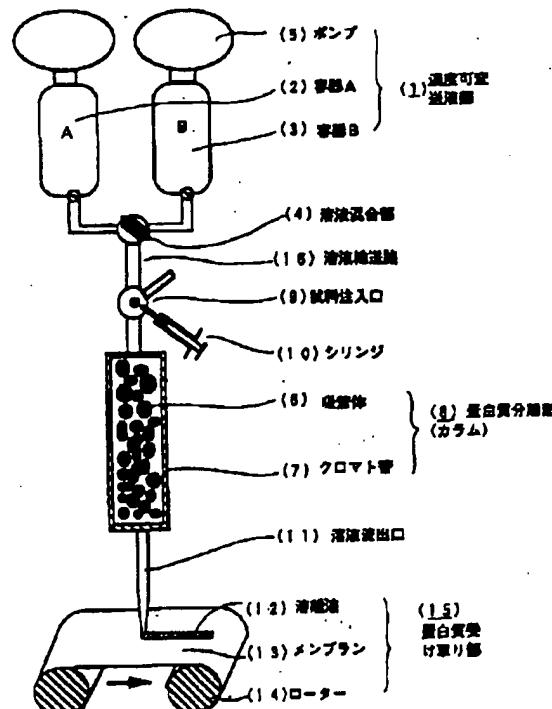
最終頁に続く

## (54)【発明の名称】 蛋白質分離装置

## (57)【要約】 (修正有)

【目的】蛋白質溶液からその中に含まれている特定種類の蛋白質を精密にかつ短時間で分離する。

【構成】2種類の緩衝液を混合しながら経時に濃度勾配をつけて、緩衝液の溶液を送る濃度可変送液部1を備える。制限酵素Eco RIと特異的に結合する配列を持つDNAをその端末でシリカ粒子に結合して、固定化してなるゲルを細径クロマト管に充填したカラム8を設ける。制限酵素Eco RIを含む蛋白質溶液をカラムに注入して、予めゲルに制限酵素Eco RIを結合させておく。経時に濃度勾配をつけた緩衝液の溶液をカラムに注入して、緩衝液の溶液が一定濃度になったときに制限酵素Eco RIを溶出させる。カラムから流出する緩衝液の溶液をニトロセルロースのメンブラン上に展開させ、制限酵素Eco RIを含む部分を取り出す。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】溶液の濃度を経時に変化させながら送液し得る濃度可変送液部と、蛋白質溶液試料中の各種蛋白質を分離する蛋白質分離部と、前記濃度可変送液部からの溶液を前記蛋白質分離部に輸送する溶液輸送路と、前記蛋白質分離部において前記溶液によって分離された蛋白質を含む前記溶離液を経時に受け取る蛋白質受け取り部とを有し、前記蛋白質分離部又は前記溶液輸送路には蛋白質溶液試料を注入する試料注入入口が設けられ、溶離液を前記蛋白質受け取り部に流出する溶液出口が設けられている蛋白質分離装置において、前記蛋白質分離部が前記溶液の供給、通過時の圧力による変形破壊を起さないだけの十分な強度の硬質担体に特定蛋白質を特異的に吸着し得る核酸を固定化してなる吸着体を有することを特徴とする蛋白質分離装置。

【請求項2】蛋白質分離部が内横断面積4mm<sup>2</sup>以下であるクロマト管を用いたカラムである請求項1記載の蛋白質分離装置。

【請求項3】クロマト管の内横断面積が1mm<sup>2</sup>以下である請求項2記載の蛋白質分離装置。

【請求項4】特定蛋白質を特異的に吸着し得る核酸がその末端で硬質担体に固定化している請求項1記載の蛋白質分離装置。

【請求項5】硬質担体が静水圧10Kg/cm<sup>2</sup>に耐え得る強度を有する請求項1又は4記載の蛋白質分離装置

【請求項6】硬質担体が静水圧100Kg/cm<sup>2</sup>に耐え得る強度を有する請求項5記載の蛋白質分離装置

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、分子生物学等の分野において使用される、蛋白質溶液から或る核酸の配列に特異的に結合する蛋白質を精密かつ短時間で分離するための蛋白質分離装置に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】DNA結合蛋白質を分離するための従来技術として、オープンカラムクロマトグラフィー（アフィニティーコロマトグラフィー、ゲル滲過）を用いて、蛋白質溶液を蛋白質の固定層と移動層との分配係数の差を利用して分離し、この溶液の画分を時間とともに試験管等の容器に分取して、物質を分離する方法がある（従来技術1）。また、試料溶液をゲル電気泳動後、特定のバンド部分のゲルを切り出して、試料溶液中に含まれていた物質を分画する方法が採られていた（従来技術2）。更に、試料溶液をショ糖等で密度勾配をつけた遠心管に添加して、10,000～80,000回転／分の遠心分離にかけ、試料溶液中の物質を密度に準じて分画し、次いで、分画された物質を注射針で取り出して、その物質を分取する方法も採られていた（従来技術3）。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来技術1では、セルロース、アガロース等の多糖類等の軟質担体からなるいわゆるソフトゲル（例えば、セファロース；ファルマシア社製商品名）を用いたオープンカラムを使用していた。しかしながらソフトゲルは一般に物理的強度が弱いため、高い静水圧を掛けると例えば構造破壊等のゲルの構造的変化によって分離能が低下する。一方、低静水圧では、送液の速度が遅くなり、そのためカラム内で一旦分離された物質が拡散の影響により精密な濃度勾配を維持することができなくなり、高い分離能を得ることが困難であり、また、分離に長時間を要した。

【0004】また、順次カラムから流出する異なる種類の蛋白質を含む溶液を、一定容量（例えば、5ml）の容器に分取すると、例えば、次の容器に切り替わるときに溶液に分離された特定種類の蛋白質が多く含まれている場合において、その特定種類の蛋白質が別の容器に分かれたり、次の容器に分取された他の種類の蛋白質と混合したりすることがある。分取する容器の容量を更に小さくすることによって、他の蛋白質との混同をある程度防止することができるが、精密な分離には限度があり、また操作も極めて繁雑であった。

【0005】従来技術2では、蛋白質を精密に分離することができるが、バンド部分から蛋白質を取り出すことが非常に困難であった。従来技術3では、注射針で分離された蛋白質を取り出す操作は極めて注意力を要し、困難であった。

【0006】本発明は、上記の従来技術における課題を解決ためになされたものであって、蛋白質を精密かつ短時間で分離するための装置を提供するものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明の要旨とするところは、溶液の濃度を経時に変化させながら送液する濃度可変送液部と、蛋白質溶液試料中の各種蛋白質を分離する蛋白質分離部と、前記濃度可変送液部からの溶液を前記蛋白質分離部に輸送する溶液輸送路と、前記蛋白質分離部において前記溶液によって分離された蛋白質を含む前記溶離液を経時に受け取る蛋白質受け取り部とを有し、前記蛋白質分離部又は前記溶液輸送路には蛋白質溶液試料を注入する試料注入入口が設けられ、溶離液を前記蛋白質受け取り部に流出する溶液出口が設けられている蛋白質分離装置において、前記蛋白質分離部が前記溶液の供給、通過時の圧力による変形破壊を起さないだけの十分な強度の硬質担体に特定蛋白質を特異的に吸着し得る核酸を固定化してなる吸着体を有することを特徴とする蛋白質分離装置にある。

【0008】以下、本発明を図を参照しながら説明する。本発明において、溶液の濃度例えは、組成、イオン強度pH等を経時に変化させながら送液し得る濃度可変送液部は、例えば、図1に示す様に構成された装置を

用いることができる。すなわち、図1において、濃度可変送液部1は、蛋白質分離部中8の吸着体6において特異的に吸着された蛋白質を吸着体6から解離することができる溶液の溶媒と溶質それぞれ収容する容器A2及び容器B3と、該容器A2と容器B3からの溶媒と溶質をその混合比率を変えながら混合する溶液混合部4とポンプ5とから構成されている。容器A2及び容器B3には、それぞれ濃度の異なる溶液を収容してもよい。

【0009】本発明において、蛋白質分離部8は、例えば、特定蛋白質を吸着する吸着体をクロマト管7に充填したカラム8からなる。蛋白質分離部カラム8に用いられる吸着体は、例えば、無機高分子（シリカ、多孔質ガラス等）、天然または合成有機高分子（エボナイト、メラミン、ポリエーテルエーテルケトン等）で、核酸と固定化できる官能基をもつ物質、又は物理的、化学的方法により官能基を導入できる物質であるか、又は金属（酸化チタン等）、セラミックス（窒化ケイ素等）、結晶板（食塩等）を表面処理して、核酸を固定化できるように処理した硬質担体の粒子に、特定の蛋白質と結合する核酸を好ましくはその末端部において、固定化したものである。硬質担体の強度は、溶液供給、通過時の静水圧 $10\text{Kg}/\text{cm}^2$ 、好ましくは $100\text{Kg}/\text{cm}^2$ に十分耐えられるだけの強度を有するものである。粒子の径として、 $10\mu\text{m}$ 以下のものが好ましい。その理由は、 $10\mu\text{m}$ 以下であれば吸着体内における粒子の表面積を充分にとることができるのである。

【0010】例えば、蛋白質溶液試料中に含まれる制限酵素Eco RIを本発明の装置によって分離する場合は、用いられる吸着体は、粒子に以下の配列を持つDNAを結合、固定化したものである。

#### 【0011】

(a) 5' X CGG ATA TAT GAA TTC GCG CG 3'  
(b) 3' GCC TAT ATA CTT AAG CGC GC 5'

なお、制限酵素Eco RIが結合する部位は、下線箇所である。

【0012】上記DNAをシリカ粒子（粒径： $5\mu\text{m}$ ）に固定化し、DNAアフィニティーカラムを調整する方法は、例えば、以下のようにして行う。精製された上記

(a) 及び (b) の配列を持つDNA各々 $100\mu\text{m}$ を減圧下で乾燥した後、 $1\text{M NaCl}$   $100\mu\text{l}$ に溶解し、 $0.4\text{M NaHCO}_3$  (pH 7.5)  $100\mu\text{l}$ を加える。しかし後、 $95^\circ\text{C}$ 水浴上で2分間処理後、20分間かけて、 $55^\circ\text{C}$ まで冷却することでアニーリングする。これにトレシル活性化シリカゲル $20\text{mg}$ を加え、室温で24時間反応させる。反応終了後、ゲルを $1\text{M NaCl}$ で3回洗浄し、遠心後残渣としてDNAを固定化する。これを緩衝液A ( $0.5\text{M NaCl}$ , pH 7.5,  $1\text{mM EDTA}$ ,  $10\text{mM}$  リン酸) に懸濁し、パッカーに入れ、緩衝液B ( $150\text{mM NaCl}$ ,  $10\text{mM}$  リン酸) で送液し、クロマト管6に充填す

る。緩衝液C ( $40\text{mM Tris-HCl}$ , pH 7.5,  $0.2\text{M NaCl}$ ,  $5\text{mM EDTA}$ ,  $2\text{mM DTT}$ ) を送液してカラムを洗浄し、DNAアフィニティーカラムを得る。

【0013】カラムにおける吸着体6は、図2に示す部分拡大図の様なものと考えられる。すなわち、支持体たる担体21に核酸22の末端が結合固定化されている。なお、担体粒子に固定化する、特定の蛋白質と特異的に結合する物質は、合成機により合成して得たDNAに限られるものではなく、天然のDNA、RNA等も使用することができる。カラムのクロマト管7は、 $100\text{Kg}/\text{cm}^2$ の静水圧に耐え得るものであって溶液に不活性のものであれば、特に限定されない。例えば、金属管（ステンレス等）、プラスチック（高密度ポリエチレン等）、無機物質（ガラス等）を用いることができる。クロマト管7の内横断面積は、 $4\text{mm}^2$ 以下であるがなお一層蛋白質の分離を精密に行うことができるので好ましい。

【0014】その理由として考えられることは、 $4\text{mm}^2$ 以下では、本発明において上記吸着体を用いた場合に、径方向への蛋白質の拡散が抑制されるためであると思われる。特に、内横断面積が $1\text{mm}^2$ 以下である場合は、水の粘性による影響を受けるので与える静水圧が高くなり、より好ましい。蛋白質溶液試料は、試料注入口9から例えばシリンジ10を用いてカラム内に注入することができる。

【0015】本発明において、蛋白質受け取り部15は、例えば、図1に示す様なメンブラン13の上に、分離された蛋白質を含む溶液を、ローター14により順次30展開する装置であっても良い。又は、平板面上に、展開された溶液からなる溶離液12の方向は、直線でも、渦巻き状でも良く、特に限定されるものではない。メンブラン11上に展開する装置の場合は、メンブラン11の材質として、例えば、二トロセルロース、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン等の天然又は合成有機高分子材料、或は、シリコーン樹脂等の無機高分子、アルミニウム等の金属を用いることができる。

#### 【0016】

【実施例】図1に示すの容器A2、容器B3及び溶液混合部4からなる濃度可変送液部1を備える蛋白質分離装置を用い、容器A2に収容する緩衝液Cと容器B3に収容する緩衝液D ( $40\text{mM Tris-HCl}$ ,  $1.5\text{M NaCl}$ , pH 7.5,  $5\text{mM EDTA}$ ,  $2\text{mM DTT}$ ) を、濃度勾配（時間的濃度変化）が10分間で緩衝液Dが0%から100%になるように混合し、流速 $0.3\text{ml}/\text{分}$ で、送液し、溶液輸送路16を介して、蛋白質分離部8に輸送した。

【0017】本実施例において使用した蛋白質分離部8は、内径 $2.1\text{mm}$ 、長さ $100\text{mm}$ のクロマト管7

(ステンレス製)に、粒子径5μmのシリカゲルに制限酵素Eco RIに特異的に結合するDNAをその末端において固定して形成したゲルを充填したものである。

【0018】なお、上記溶液を輸送するに先立って、蛋白質溶液試料として、緩衝液Cを溶媒とするEco RIを含む蛋白質粗溶液を用い、蛋白質分離部の一端に設けられた試料注入口よりシリンジを用いて200μl注入して、15℃、1時間反応させて、ゲルにEco RIを特異的に結合させる。上記溶液を10分間蛋白質分離部8を通して、Eco RIを溶出した。次いで、Eco RIを含む溶液を蛋白質分離部5の他端に設けた溶液出口11より流出させ、蛋白質受け取り部15に展開させた。

【0019】 本実施例において備えた蛋白質受け取り部15は、メンプラン13として1.5cm/分の速度で移動するニトロセルロース膜（アマシャム社製）からなるものである。ニトロセルロース膜は、幅50mm、長さ300mm、で、予め結合溶液（HEPES：1.0 mM、NaCl：50mM、MgCl<sub>2</sub>：10mM、EDTA：0.1mM、DTT：1mM、脱脂粉乳2.5%）で湿った状態で用いた。

【0020】本実施例よりEco RIが分離されたことの確認は、以下の方法で行った。Eco RIと結合する配列を持つDNA二重鎖を合成し、<sup>32</sup>Pで標識する。この標識DNA  $1 \times 10^5$  cpm/mIを含む0.2 MKCI結合溶液に、本実施例で得た、ニトロセルロース膜を浸し、DNAと蛋白質とを反応させた。0.2 MKCI結合溶液で1時間洗浄後、オートラジオグラフィーにより測定した。その結果、発色した箇所が1スポットであった。このことから、本実施例によりEco

R-Iが特異的に溶出され、分離されたことが確認された。

[0021]

【発明の効果】本発明により、特定種類の蛋白質を精密にかつ短時間で分離することができ、しかも従来技術に比べて母液の量が少なくて済む。

### 【図面の簡単な説明】

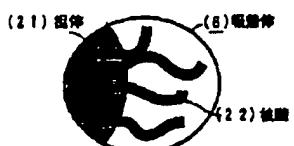
【図1】 本発明の一実施例を示す概略図

【図2】 図1に示す一実施例の蛋白質分離部において使用される吸着体の部分拡大図である。

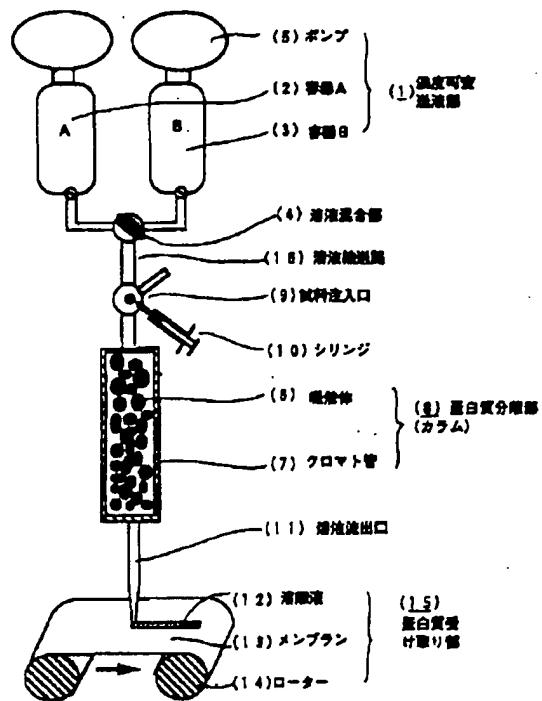
### 【符号の説明】

- 1 . . . 濃度可変送液部
  - 2 . . . 容器A
  - 3 . . . 容器B
  - 4 . . . 溶液混合部
  - 5 . . . ポンプ
  - 6 . . . 吸着体
  - 7 . . . クロマト管
  - 8 . . . 蛋白質分離
  - 9 . . . 試料注入口
  - 10 . . . シリンジ
  - 11 . . . 溶液流出口
  - 12 . . . 溶離液
  - 13 . . . メンブラン
  - 14 . . . ローター
  - 15 . . . 蛋白質受け取り部
  - 16 . . . 溶液輸送路
  - 21 . . . 抗体
  - 22 . . . 核酸

〔圖2〕



【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 梅本 みさ子

大阪市此花区島屋一丁目1番3号 住友電  
気工業株式会社大阪製作所内

(72)発明者 宇野 敏史

大阪市此花区島屋一丁目1番3号 住友電  
気工業株式会社大阪製作所内